

# Diagnostic impact of the cyst fluid telomerase activity measurement using droplet digital PCR for predicting the histologic grade of cystic neoplasms of the pancreas

著者	畠 達夫
号	86
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3558号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00123239">http://hdl.handle.net/10097/00123239</a>

氏 名	はた たつお 畠 達夫
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 28 年 9 月 26 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学 専攻
学位論文題目	<u>Diagnostic impact of the cyst fluid telomerase activity measurement using droplet digital PCR for predicting the histologic grade of cystic neoplasms of the pancreas</u> (デジタル PCR を用いた膵嚢胞液中のテロメラーゼ活性測定は嚢胞性膵腫瘍の良悪性の鑑別診断に有用である)
論文審査委員	主査 教授 海野 倫明 教授 今谷 晃 教授 張替 秀郎

## 論文内容要旨

嚢胞性膵腫瘍とは、通常型膵癌とは異なり slow growing で比較的予後良好な疾患群であり、良性から上皮内癌、更に浸潤癌に至るまで幅広い悪性度を有することが特徴的である。診療方針の選択として、現行の国際診療ガイドラインでは CT/MRI の画像診断と臨床症状を軸としたリスク分類ならびに精査として超音波内視鏡検査(EUS)が推奨されているが、特に膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) に対しては低～中等度異型は経過観察可能、上皮内癌の時点で外科的根治切除を行うことで良好な予後が得られるため、術前の正確な悪性予測診断と適切な時期での手術介入が求められる。画像診断に加え、研究段階として嚢胞液中の細胞診や CEA やムチン蛋白などの分子マーカーの有用性について報告があるが、未だ満足しうる診断精度は得られていない。

テロメラーゼは細胞分裂により短縮した DNA 末端に反復配列を付加する作用を有する。造血幹細胞、胚細胞では恒常的にテロメラーゼ活性が高く、細胞は不死化状態にある。さらに癌細胞においても高いテロメラーゼ活性が認められることが知られており、様々な癌腫において良悪性の鑑別診断に有用であるとの報告がある。近年、telomeric repeat amplification protocol 法と droplet digital PCR を組み合わせることにより(dd-TRAP 法)、培養細胞において高感度かつ定量的なテロメラーゼ活性測定が可能であるとの基礎的研究結果が報告された(Ludlow AT et al. Nucleic Acids Res 2014;42:e104)。

今回の研究では、膵嚢胞液中の新たな診断マーカーとしてのテロメラーゼ活性に注目し、臨床検体サンプル(膵嚢胞穿刺液)を用いた際の dd-TRAP 法の適用性と実用性を明らかにすることを目的とした。具体的には dd-TRAP 法を用いて膵嚢胞液中のテロメラーゼ活性を高感度かつ定量的に測定することで、嚢胞性膵腫瘍の悪性化予測が可能かについて検討をすることを目的とした。外科的に切除され、組織学的確定診断の得られている嚢胞性膵腫瘍 184 例から穿刺吸引した嚢胞液のテロメラーゼ活性を dd-TRAP 法を用いて測定し、組織学的診断別に比較検討した。

細胞株を用いた検討では、古典的な電気泳動を用いた TRAP 法と比較して、dd-TRAP 法ではより高い検出感度と広い測定レンジが得られた。膵嚢胞液を用いた解析では、テロメラーゼ活性は組織学的異型度に関わらず、過去に凍結融解されていない、つまり蛋白質の integrity が高いとされる嚢胞液サンプル(計 84 例)で高値を示した。この 84 例を対象に詳細な検討を加えたところ、浸潤癌/高度異型群の膵嚢胞液中のテロメラーゼ活性(1299 copies/μL of cyst fluid)は対象群(23.1 copies/μL of cyst fluid)と比較して有意に高値であり、カットオフ値を 730 copies とすると、感度 83.3%、特異度 90.0%で良悪性の鑑別診断が可能であった。更に、ガイドラインに基づ

(書式12)

いた悪性化リスク分類別にサブグループ解析を行ったところ、画像診断上悪性の疑いがあり EUS が考慮されうる、“worrisome features”を有するサブグループで最も高い診断能が得られた(感度 92.3%, 特異度 86.5%, 正診率 88.0%)。多変量解析では嚢胞液中のテロメラーゼ活性高値( $\geq 730$  copies/ $\mu$ L cyst fluid)は独立した悪性予測因子であった(オッズ比, 41.49; 95%信頼区間, 4.90–992.73;  $P=0.0002$ )。

dd-TRAP 法を用いて膵嚢胞液中のテロメラーゼ活性を高感度かつ定量的に測定することは、嚢胞性膵腫瘍の良悪性の鑑別診断に有用である。

以上

## 審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 Diagnostic impact of the cyst fluid telomerase activity measurement using droplet digital PCR for predicting the histologic grade of cystic neoplasms of the pancreas  
(デジタル PCR を用いた膵嚢胞液中のテロメラーゼ活性測定は嚢胞性膵腫瘍の良悪性の鑑別診断に有用である)

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 消化器外科学 分野

学籍番号 B2MD5102 氏名 梶 達夫

本研究は、膵嚢胞液中の新たな診断マーカーとしてのテロメラーゼ活性に注目し、従来のテロメラーゼ活性測定法である telomeric repeat amplification protocol (TRAP)法とデジタル PCR を組み合わせた dd-TRAP 法を用いて、膵嚢胞穿刺液中のテロメラーゼ活性を高感度かつ定量的に検出・測定することを試みたもので、以下の結果を得ている。

1. 既報のプロトコルを改変し、膵癌細胞株から得られた細胞抽出液を用いて dd-TRAP 法を行い、検出された PCR 産物とそのコピー数はテロメラーゼ活性を直接的に示すことを明らかにした。
2. 従来の電気泳動を用いた TRAP 法と比較して、dd-TRAP 法ではより高い検出感度と広い測定レンジが得られた。Non-template control サンプルと希釈サンプルを用いた検討により、検出限界(limit of detection, LOD)を設定した。
3. 臨床検体である膵嚢胞液を用いて検討するにあたり、測定単位を膵嚢胞液 1  $\mu\text{L}$  あたりのテロメラーゼ活性として定量するためにいくつかの条件を検討した。更に inter-day assay を行い測定結果の再現性を確認した。
4. 膵嚢胞液を用いた解析では、浸潤癌/高度異型群の膵嚢胞液中のテロメラーゼ活性は、対象群(中～低異型度または良性群)と比較して有意に高値を示した。特に、過去に凍結融解されていない、つまり蛋白質の integrity が高いとされる嚢胞液サンプル(計 84 例)中の比較検討において最も顕著な差を認めた。さらに、カットオフ値を 730 copies/ $\mu\text{L}$  cyst fluid とすると、感度 83.3%、特異度 90.0%で嚢胞性膵腫瘍の良悪性の鑑別診断が可能であった。
5. 現行の診療ガイドラインに基づき、悪性化リスク分類別にサブグループ解析を行ったところ、画像診断上悪性の疑いがあり超音波内視鏡検査が考慮されうる、“worrisome features”を有するサブグループで最も高い診断能が得られた(感度 92.3%, 特異度 86.5%, 正診率 88.0%)。
6. 多変量解析では嚢胞液中のテロメラーゼ活性高値( $\geq 730$  copies/ $\mu\text{L}$  cyst fluid)は独立した悪性予測因子であった。

本研究は、実際の患者より得られた臨床検体である膵嚢胞液のテロメラーゼ活性を高感度かつ定量的に検出・測定することで、嚢胞性膵腫瘍の良悪性の鑑別診断への有用性を明らかにしたものであり、実際の臨床診断の場への橋渡しとなりうる点で非常に意義のあるものと言える。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。